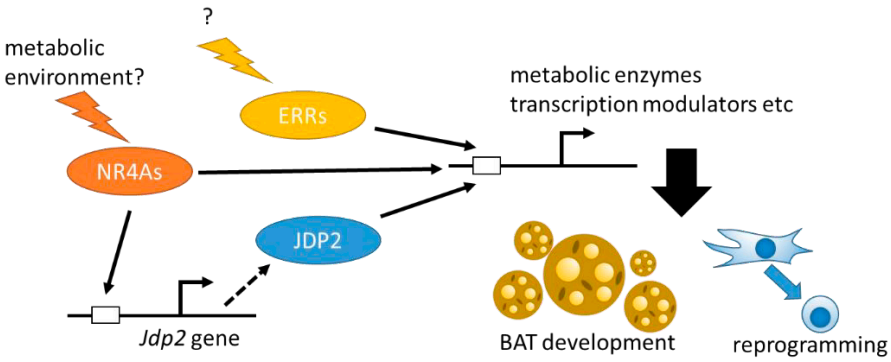
32　免疫、がん、脂肪、初期化に共通する代謝コードの解読	熊谷　雄太郎

【目的】本研究は免疫応答、がん、脂肪組織分化成熟、細胞初期化等に関与する栄養代謝変化と遺伝子発現変化を統一的見地から横断的に解析し、それらに共通する栄養代謝変化によって生じる情報伝達の分子機構と生理的意義を明らかにすることを目的とした研究である。免疫系における分化、応答と代謝の変化を研究する immunometabolism、好気的条件下にもかかわらず解糖系が優位に働く Warburg 効果を始めとした cancer metabolism 研究等を横断的に見ることで、異なる細胞・組織における異なる現象であるにもかかわらず、代謝変化とそれに呼応するように発現変化する遺伝子の組合せ―これを「代謝コード」と呼称する―が共通して存在する可能性が暗示される。本研究ではこの「代謝コード」を解読する装置として核内レセプタに注目し分子機構を明らかにしながら、「コード」の異なる細胞・組織における役割を横断的に「解読」することを目指した。

【方法および結果】褐色脂肪細胞（BAT）は脂質を貯蔵するのみならず代謝することで余剰脂質を減少させるとともに熱を発生させる組織である。胎生 18 日齢、生後 4 日齢、10 日齢、4 週齢、8 週齢の野生型マウスから BAT を回収し、経時的トランスクリプトームデータを取得した。また、同時にメタボロームデータを取得した。主成分分析により、遺伝子発現、代謝物の量ともに胎生 18 日齢から生後 4 日齢の間と 10 日齢から 4 週齢の間に大きな変化があることが示唆された。階層的クラスタリングにより遺伝子発現のパターンに基づいた遺伝子クラスターを同定し、得られたクラスター内の遺伝子プロモーター配列に存在する転写因子結合モチーフを検索し有意に多いものを抽出したところ、胎生 18 日齢から生後 4 日齢の間に発現が上昇する遺伝子クラスターを制御する転写因子の候補として JDP2 が同定された。そこで *JDP2* 遺伝子欠損マウスの BAT 重量を計測したところ、野生型よりも有意に BAT 重量が小さく、JDP2 が BAT の発生・機能に関与していることが示唆された。しかしながら BAT マーカー遺伝子の発現は野生型と *JDP2* 欠損組織において差は見られなかった。JDP2 は脂肪細胞の分化を制御しているという報告もあるが、本研究では胎生 18 日齢から生後 4 日齢の間において遺伝子の変化を促しているが成熟後は機能に影響しない可能性が示唆された。胎生 18 日齢から生後 4 日齢の間に発現が上昇する遺伝子クラスターに含まれる核内レセプタ NR4A1、2、3（NR4As）の認識配列は JDP2 プロモーターに見られ、NR4As が JDP2 を制御している可能性が暗示された。BAT の機能を制御していると言われる核内レセプタ ERRγや JDP2 はいずれも細胞の初期化に関与しているという報告があることから、NR4As の細胞初期化への関与を調べるために阻害剤 camptothesin を用い、細胞の初期化に及ぼす影響を評価したところ、初期化が阻害され、幹細胞マーカー遺伝子の発現も減少していた。この結果は NR4As が細胞初期化を制御する因子であることを示唆する。本研究により代謝システム、初期化、免疫系に共通する、NR4As、JDP2、ERRs を含む転写因子ネットワークの一端を明らかにした（図）。今後は核内レセプタの認識する環境変化、その生体内での役割を解析することで、「代謝コード」を解読する装置として核内レセプタとその制御の分子機構が明らかになると期待される。

NR4As－JDP2－ERRs 転写因子ネットワークによる生命現象の制御



32. 免疫、がん、脂肪、初期化に共通する代謝コードの解読

熊谷　雄太郎

産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 ステムセルバイオテクノロジー研究グループ

Key words：褐色脂肪組織，細胞初期化，核内レセプタ，転写因子

緒　言

本研究は免疫応答、がん、脂肪組織分化成熟、細胞初期化に関与する栄養代謝変化と遺伝子発現変化を統一的見地から横断的に解析することにより、それらに共通する栄養代謝変化によって生じる情報伝達の分子機構と生理的意義を明らかにすることを目的とするものである。

近年、免疫系における分化、応答と代謝の変化を研究する immunometabolism や、がんにおいては好気的条件下にもかかわらず解糖系が優位に働く Warburg 効果を始めとした cancer metabolism の研究が盛んに行われている。T 細胞は naïve な状態においては酸化的リン酸化や脂肪酸のβ酸化を利用してエネルギーを得ているが、effector になる場合は解糖系および glutamine を利用する glutaminolysis が優位になり、これらの代謝に関与する酵素を阻害すると effector への分化が阻害されることが知られている。さらに、effector から memory へと変化する場合においては解糖系、glutaminolysis 優位から再び酸化的リン酸化及び脂肪酸β酸化優位へと変化する。制御性 T 細胞（Treg）と helper T 細胞の分化においても代謝系の重要性が指摘されており、Treg は酸化的リン酸化と脂肪酸β酸化、Th17 などにおいては解糖系がそれぞれ優位である。また、マクロファージにおいても M1 型の活性化においては解糖系、M2 型の場合は脂肪酸β酸化が優位であるという報告がある。がんにおいては前記の Warburg 効果のみならず、glutaminolysis の亢進といった metabolic reprogramming が起きるとされている。

代謝研究の一方で、“neutrigenomics”などとも称される栄養、代謝の変化が遺伝子発現に影響する機構の研究が近年のメタボローム解析手法の発展とともに進展しつつある。我々はこういった代謝変化を遺伝子発現の変化につなげる機構の一つとして核内レセプタに注目している。山中 4 因子による細胞初期化において一過的に酸化的リン酸化が亢進することが知られているが、これを核内レセプタ ERRα／ERRγがコントロールしていることが共同研究者によって明らかとなっている［1］。上記の T 細胞やマクロファージの活性化、分化においても、PPARγ、ERRα／ERRγ等の関与が報告されており、代謝変化と遺伝子変化を結びつける核内レセプタの重要性が示唆されるとともに、異なる細胞や組織においても代謝変化と遺伝子発現を同時に横断的に見ることによって重要な代謝変化、核内レセプタを同定することが可能であることを暗示している。さらに、PPARγ、ERRα／ERRγはいずれも脂肪細胞、特に褐色脂肪組織の分化に関与するとの報告がある［2］。

このように、異なる細胞・組織における異なる現象であるにもかかわらず、代謝変化とそれに呼応するように発現変化する遺伝子の組合せ―これを「代謝コード」と呼称する―が共通して存在する可能性がある。本研究ではこの「代謝コード」を解読する装置として核内レセプタに注目し分子機構を明らかにしながら、「コード」の異なる細胞・組織における役割を横断的に「解読」することを目指した。

方法および結果

1. 褐色脂肪組織（BAT）トランスクリプトームとメタボロームは 2 回の大きな変化を示す

褐色脂肪細胞（brown adipose tissue：BAT）は脂質を貯蔵するのみならず代謝することで余剰脂質を減少させるとともに熱を発生させる組織である。胎生 18 日齢、生後 4 日齢、10 日齢、4 週齢、8 週齢の野生型マウスから BAT を回収し、TRIzol により RNA を抽出後、Agilent 社の説明に従い cDNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム

解析を行った（産総研の木田泰之氏との共同研究）。発現変化に基づき階層的クラスタリングを行ったところ 10 個の異なる時系列を持つクラスターが得られた（図 1A）。トランスクリプトーム変化の全体像を得るため、主成分分析を行ったところ、胎生 18 日齢から生後 4 日齢の間と 10 日齢から 4 週齢の間に大きな変化があることが示唆された（図 1 B）。さらに、BAT を回収、メタボローム解析（ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社）に供した（図 1C : 産総研の木田泰之氏との共同研究）。主成分分析を行ったところ、トランスクリプトームデータと同様に胎生 18 日齢から生後 4 日齢の間と 10 日齢から 4 週齢の間に大きな変化があることが示唆された（図 1D）。特に、G1P、G6P、F6P 等解糖系の中間代謝物の量が急激に減少していた。これらの結果から、胎生 18 日齢から生後 4 日齢の間、10 日齢から 4 週齢の間に BAT の機能、成熟に関与する遺伝子発現・代謝状態の変化があることが示唆される。

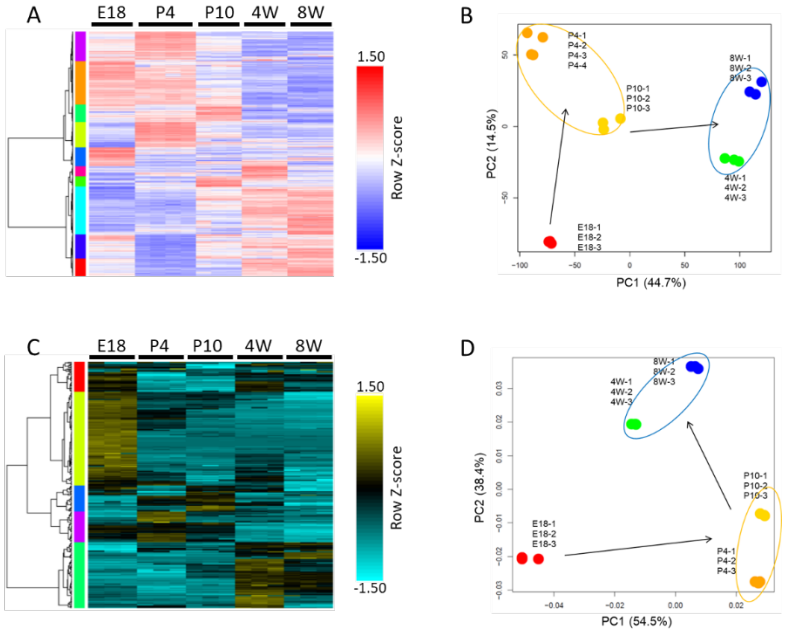


図 1. BAT 成熟の時系列トランスクリプトーム・メタボローム解析

(A) BAT マイクロアレイデータのヒートマップ図。蛍光強度が 1.5 倍以上変化し、かつ Benjamini-Hochberg 法により求めた *q* value が 0.05 以下のプローブを抽出し、階層的クラスタリングを行った。E18、P4、P10、4W、8W はそれぞれ胎生 18 日齢、生後 4 日齢、10 日齢、4 週齢、8 週齢を表す。

(B) トランスクリプトームデータの主成分分析。バックグラウンド以上と判定されたプローブの強度を抽出し、主成分得点を計算後、第 1、第 2 主成分についてプロットした。E18、P4／P10、4W／8W の 3 つに分かれる。

(C) BAT メタボロームデータのヒートマップ図。同定された全代謝物の量をもとに階層的クラスタリングを行った。

(D) メタボロームデータの主成分分析。E18、P4／P10、4W／8W の 3 つに分かれる。

2. トランスクリプトーム解析により BAT 成熟に必須の転写因子ネットワークが推測される

トランスクリプトーム、メタボロームの解析から、胎生 18 日齢から生後 4 日齢の間、10 日齢から 4 週齢の間に大きな発現変化のある遺伝子群に注目して解析を行うこととした。トランスクリプトームデータの階層的クラスタリングの結果から、生後 4 日齢において急激に発現が上昇する遺伝子のクラスターが抽出された（図 2A）。興味深いことに、*PGC-1α*（*Ppargc1a*）がこのクラスターに含まれており、図 2B に示したように生後 4 日齢において発現が上昇していた。核内レセプタの PPARγ コファクターである PGC-1α は BAT の発生に必須であることが知られていることから、このクラスターに含まれる遺伝子が BAT の機能、成熟に関与していることを暗示する。このクラスターに含まれる遺伝子の発現制御機構について調べるため、プロモーター配列を取得し、JASPAR データ

ベースからダウンロードした転写因子結合モチーフデータを用いてプロモーター領域における転写因子結合モチーフを検索した（京都大学の Alexis Vandenbon 氏との共同研究）。ある転写因子結合モチーフを持つ当該クラスター内の遺伝子数とゲノム全体の遺伝子数とを数え、フィッシャーの直接確率検定によって p value を計算し、有意なものを探索したところ、転写因子 JDP2／Jundm2 や、BAT の発生への関与が報告されている USF1［3］等の結合モチーフが有意に多く含まれていた（図 2C）。この中で最も enrich している *Jdp2* はこの遺伝子クラスターに含まれており、その発現は生後 4 日齢、10 日齢、4 週齢において高かった（図 2D）。この結果は JDP2 の BAT 発生への関与を示唆していることから、*Jdp2* KO マウス［4］における BAT の発生を検討した（生理学研究所の丸山健太氏との共同研究）。12 週齢のマウスから BAT を回収し、その重量を計測したところ、*Jdp2* KO マウスにおいて有意に BAT 重量が低かった（図 2E；各 $n=3$、$p=0.0375$、片側 t-test）。この結果は JDP2 が BAT の発生成熟において重要な転写因子であることを示している。しかしながら、これら BAT 組織における BAT 特異的な遺伝子の発現を定量的リアルタイム PCR（qPCR）によって測定したところ、WT と KO で有意な差は見られなかった（図 2F）。また、WAT におけるマーカー遺伝子群の発現の差も見られなかった（data not shown）。

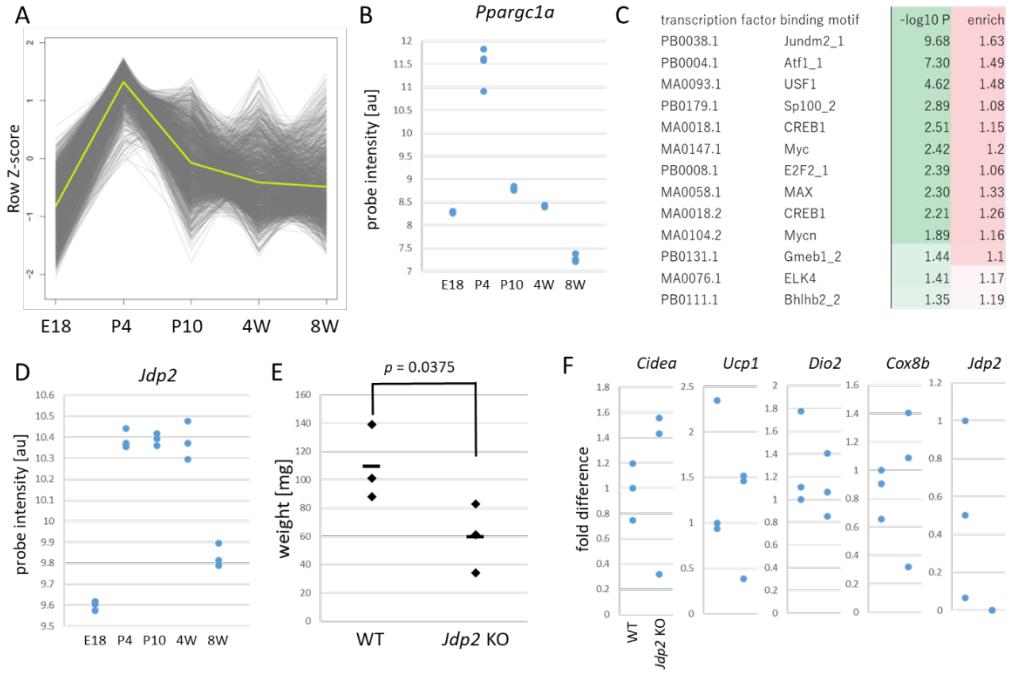


図 2. 生後 4 日齢に発現上昇する遺伝子群のプロモーターに結合モチーフが多く含まれる転写因子 JDP2 は BAT の発生に関与している

(A) BAT マイクロアレイデータから抽出された 1 つの遺伝子クラスターの発現量変化。灰色の折れ線群は各遺伝子の発現変化を、黄色の折れ線はクラスター内の平均を表す。

(B) *Pppargc1a*、*Ppargc1b* 遺伝子の BAT における発現変化。

(C) 遺伝子クラスターのプロモーター解析結果。

(D) *Jdp2* 遺伝子の BAT における発現変化。

(E) WT および *Jdp2* KO マウスにおける BAT 重量（各 $n=3$、$p=0.0375$、片側 t-test）。

(F) BAT における遺伝子発現。

3. 細胞初期化に重要なファクターである NR4As を起点とする転写因子ネットワーク

以上の解析から、生後 4 日齢において急激に発現が上昇する遺伝子のクラスターが存在し、その遺伝子群のプロモーターに結合部位が存在する転写因子 JDP2 が BAT の機能成熟に重要であることが示された。しかしながら、JDP2 の誘導はどのように行われるのかは不明である。そこで、緒言で述べたように、核内レセプタによる制御がある可能性を考え、生後 4 日齢において発現が上昇する遺伝子クラスター内の核内レセプタを調べたところ、NR4A1、2、

3（NR4As）が抽出された（図 3A）。JASPAR データベースより取得した転写因子結合モチーフを用いて JDP2 のプロモーターを検索したところ、ヒト *JDP2* およびマウス *Jdp2* 遺伝子のプロモーターに NR4As の結合部位が発見された（図 3B）。この結果から、NR4As が JDP2 の上流にある転写因子であることが暗示される。

緒言で述べたように BAT の発生に関与することが知られている転写因子 ERRγ は細胞の初期化にも関与している［1］。興味深いことに JDP2 も BAT の発生のみならず細胞初期化に関与しているという報告がある［5］。この類推から、NR4As も細胞の初期化に関与している可能性が推測された。そこで、NR4As を阻害することが知られている薬剤 camptothesin（CPT）を用い［6］、NR4As の阻害が細胞の初期化に及ぼす影響を評価した。SV40 で不死化したマウス胚性線維芽細胞（MEF）に Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc（OSKM）をレトロウイルスベクターにより導入し初期化を行った。この際、同時に PL-SIN-EOS-C（3+）-EiP レンチウイルスをレポーター［7］として導入し、GFP 発現によって初期化された細胞の割合を評価した。レトロウイルス感染 1 日から 5 日後までの 4 日間 NR4As 阻害剤 CPT 62.5 nM によって細胞を処理し、全く処理しないもの（mock）、CPT 処理時と同濃度の DMSO を加えたもの（DMSO）と比較した。すると、感染 19 日後の GFP 陽性細胞の割合が CPT 処理によって有意に減少した（図 3C）。また、これらの細胞における幹細胞マーカー遺伝子 *Lin28*、*Nanog*、*Fbx15* の発現を qPCR によって調べたところ、CPT 処理群において減少していた（図 3D）。これらの結果は NR4As が細胞初期化に必要であることを示唆している。

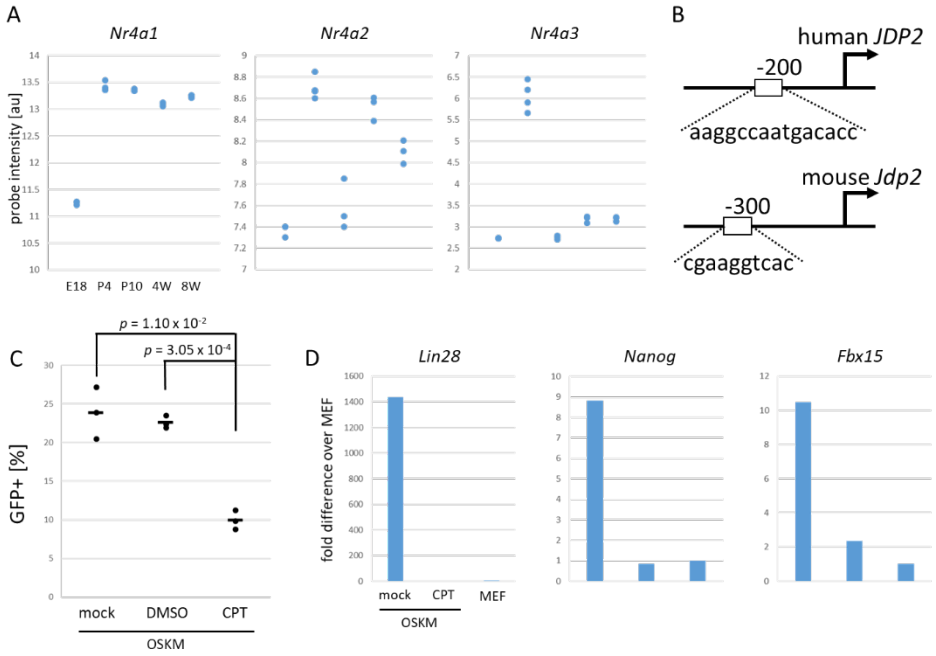


図 3. 核内レセプタ NR4As の発現パターンと細胞初期化への関与

(A) *NR4As* 遺伝子の BAT における発現変化。

(B) ヒト *JDP2*（上）、マウス *Jdp2*（下）遺伝子プロモーター領域の模式図。白い四角とその上の数字は NR4As 結合モチーフとその転写開始点に対する位置を表し、四角の下の塩基配列は結合領域の配列を表す。

(C) Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc（OSKM）による細胞初期化を PL-SIN-EOS-C（3+）-EiP レポーターに由来する GFP 陽性細胞の割合をレトロウイルス導入後 19 日で計測した。何も処理していない群（mock）、CPT 処理時と同濃度の DMSO を加えた群（DMSO）、CPT 62.5 nM によって感染後 1 日から 5 日後まで 4 日間処理した群（CPT）。各 $n=3$、両側 t-test の結果を表示。

(D) OSKM 導入後処理なし（mock）、CPT 処理（CPT）、または OSKM を導入していない MEF における *Lin28*、*Nanog*、*Fbx15* 遺伝子の qPCR 結果。

考　察

本研究においては BAT の発生成熟過程における遺伝子発現変化とその制御機構、および細胞初期化の転写因子制御機構の共通点を指標としていくつかの転写因子の機能を明らかにした。

本研究においてはまず BAT 成熟過程のトランスクリプトーム、メタボロームデータから、遺伝子発現と代謝に 2 段階の大きな変化があることを突き止め、かつ JDP2 がその 1 つ目の変化、胎生 18 日齢から生後 4 日齢の間において重要であることを示唆するデータを得た。JDP2 は好中球、破骨細胞など免疫細胞の発生に関わっている［4］のみならず、ターゲット遺伝子のエピジェネティックな変化と発現を制御することで脂肪細胞の分化に関与しているとの報告がある［8］。しかしながら、本研究においては 12 週齢のマウスにおいて BAT 重量は低下していたものの遺伝子発現の変化は見られなかったこと、JDP2 の発現も 8 週齢以降は見られないことから、胎生 18 日齢から生後 4 日齢の間において遺伝子の変化を促しているが成熟後は機能に影響しない可能性がある。今後は低温下や高脂質食などのストレスに対する応答を調べる必要がある。

JDP2 そのものも BAT において胎生 18 日齢から生後 4 日齢の間に発現が上昇するが、誘導する因子は不明であった。本研究においては核内レセプタに注目し、JDP2 プロモーターに認識配列が存在する NR4As が同様に胎生 18 日齢から生後 4 日齢の間に誘導されることを見出した。NR4As もまた脂肪細胞の分化に関与しているという報告もあり［9］、BAT における役割を精査することが必要となる。

BAT の成熟・機能に必須な遺伝子として、今回同定された JDP2 だけでなく核内レセプタ ERRγが知られている。興味深いことに、これらはいずれも細胞初期化に協同して関与しており、NR4As もまた関与している可能性が暗示された。本研究ではこの仮説を NR4As 阻害剤である CPT を用いて証明した。ERRγ、NR4As いずれもオーファン受容体で、どのように環境の変化を認識しているかは不明であり、今後の研究が待たれる。

本研究により代謝システム、初期化、免疫系に共通する、NR4As、JDP2、ERRs を含む転写因子ネットワークの一端を明らかにした（図 4）。今後は核内レセプタの認識する環境変化、その生体内での役割を解析することで、「代謝コード」を解読する装置として核内レセプタとその制御の分子機構が明らかになると期待される。

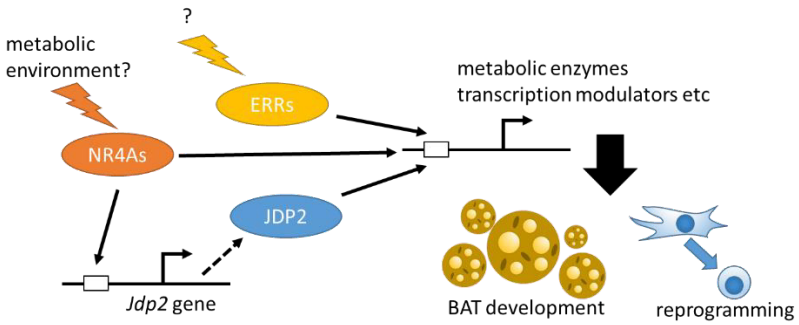


図 4.　NR4As-JDP2-ERRs 転写因子ネットワークによる生命現象の制御
NR4As、ERRs は外部の環境を感知し、JDP2 などの転写因子の制御を通じて BAT 発生や細胞初期化などを誘導すると推測される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は産業技術総合研究所の木田泰之氏、京都大学ウイルス研究所の Alexis Vandenbon 氏、生理学研究所の丸山健太氏である。

文 献

1) Kida YS et al. ERRs Mediate a Metabolic Switch Required for Somatic Cell Reprogramming to Pluripotency. Cell Stem Cell. 2015 May 7;16(5):547-55. Epub 2015 Apr 9. PMID: 25865501 DOI: 10.1016/j.stem.2015.03.001
2) Ahmadian M et al. ERRγ Preserves Brown Fat Innate Thermogenic Activity. Cell Rep. 2018 Mar 13;22(11):2849-2859. PMID: 29539415 DOI: 10.1016/j.celrep.2018.02.061
3) Laurila PP et al. USF1 Deficiency Activates Brown Adipose Tissue and Improves Cardiometabolic Health. Sci Transl Med. 2016 Jan 27;8(323):323ra13. PMID: 26819196 DOI: 10.1126/scitranslmed.aad0015
4) Maruyama K et al. The Transcription Factor Jdp2 Controls Bone Homeostasis and Antibacterial Immunity by Regulating Osteoclast and Neutrophil Differentiation. Immunity. 2012 Dec 14;37(6):1024-36. Epub 2012 Nov 29. PMID: 23200825 DOI: 10.1016/j.immuni.2012.08.022
5) Wang et al. Induction of Pluripotent Stem Cells From Mouse Embryonic Fibroblasts by Jdp2-Jhdm1b-Mkk6-Glis1-Nanog-Essrb-Sall4. Cell Rep. 2019 Jun 18;27(12):3473-3485.e5. PMID: 31216469 DOI: 10.1016/j.celrep.2019.05.068
6) Hibino S et al. Inhibition of Nr4a Receptors Enhances Antitumor Immunity by Breaking Treg-Mediated Immune Tolerance. Cancer Res. 2018 Jun 1;78(11):3027-3040. Epub 2018 Mar 20. PMID: 29559474 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3102
7) Hotta A et al. Isolation of Human iPS Cells Using EOS Lentiviral Vectors to Select for Pluripotency. Nat Methods. 2009 May;6(5):370-6. Epub 2009 Apr 26. PMID: 19404254 DOI: 10.1038/nmeth.1325
8) Nakade et al. JDP2 Suppresses Adipocyte Differentiation by Regulating Histone Acetylation. Cell Death Differ. 2007 Aug;14(8):1398-405. Epub 2007 Apr 20. PMID: 17464331 DOI: 10.1038/sj.cdd.4402129
9) Pearen MA and Muscat GEO. Minireview: Nuclear Hormone Receptor 4A Signaling: Implications for Metabolic Disease. Mol Endocrinol. 2010 Oct;24(10):1891-903. PMID: 20392876 DOI: 10.1210/me.2010-0015